

Interleukin-18-indukáló anyag**Kivonat**

5

A találmány tárgyát aktív összetevőként tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmazó interleukin-18-indukáló anyag képezi.

10 A találmány szerinti hidrolizátum készítésekor a tejsavóproteint előnyösen 20-30%-os mértékig hidrolizálják, majd a hidrolizátumból egy 10.000 D fölötti molekulatömegű frakciót eltávolítanak ultraszűrési eljárással, és a kapott hidrolizátum IL-18 indukáló anyagként alkalmazható.

„ellenző” a lra ϕ

Feuer

Interleukin-18-indukáló anyag

A találmány tárgyát aktív összetevőként tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmazó interleukin-18-indukáló anyag képezi.

- 5 A találmány szerinti hidrolizátum készítésekor a tejsavóproteint előnyösen 20-30%-os mértékig hidrolizáljuk, majd a hidrolizátumból egy 10.000 D fölötti molekulatömegű frakciót eltávolítunk ultraszűrési eljárással, és a kapott hidrolizátum IL-18 indukáló anyagként alkalmazható.

- 10 Általánosságban elfogadott, hogy a hematopoetikus sejtek növekedéséhez és differenciálódásához specifikus növekedési- és differenciálódási faktorokra van szükség. Az érett vörösvérsejtek, pl. a vörösvérsejtek, granulociták, makrofágok, acidofil sejtek, vérlemezkék és limfociták kialakulásához vezető folyamatban nagyszámú differenciálódási és növekedési faktor vesz részt.

- 15 Másrészt az élő szervezet immunválasszal reagál a baktériumok vagy vírusok okozta fertőzésre, a daganatképződésre, a citotoxikus hatásokra stb. Az immunválaszt a benne részt vevő immunsejtek közötti közvetett és közvetlen kölcsönhatások befolyásolják. Az utóbbi években a daganatterápiával kapcsolatos kutatásokban az immunrendszer működésére ható, az idegen anyagok elleni védekezőképességet javító immunmodulátor anyagokra terelődött a figyelem.

- 20 Az összefoglalóan „citokineknek” nevezett anyagokról [ide tartoznak pl. az interleukinok, a kolónia stimuláló faktorok, a tumornekrózis faktor (TNF) és az interferonok] egymás után kiderült, hogy részt vesznek a differenciálódásban, a növekedésben és az immunválaszfunkciókban. A citokinek gyógyászati készítményként történő alkalmazására szolgáló eljárások érdekében géntechnológiai úton történő előállításukra is kísérleteket tettek.

- 25 Az interleukin-18 (a továbbiakban esetenként „IL-18”) az immunrendszerbeli információátvivő anyagok egyike. Ezt a citokint az első leírásokban még interferon- γ indukáló faktornak nevezték [8-27189, 8-191098, 9-289896 számú japán nyitott szabadalmi bejelentések; Nature 378, 6552 (1995)], de a későbbiekben már az „IL-18” megnevezést alkalmazták rá [Journal of Immunology 156, 4274 (1996)].

- 30 Az interleukin-18 szerkezetileg az interleukin-1 családba tartozó protein, amely funkcionálisan az interleukin-12-vel rokon. Az interleukin-18 a T-sejtek és a „natural killer” sejtek interferon- γ termelésének erőteljes indukálószere. Emellett az interleukin-18 indukálni képes a

granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor, a tumornekrózis faktor, az interleukin-4, az interleukin-5, az interleukin-8, az interleukin-10 és az interleukin 13 termelését is. Az interleukin-18 mindezen túl fokozza a „natural killer” sejtek citotoxicitását és proliferációját [Macrophage Journal 6, 5 (1999)]; Kohei Miyazono és Kazuo Sugamura: „Cytokine and Growth Factor, Revised Edition”, pp. 46-47. kiad.: Yodosha (1998)]. A interleukin emellett elnyomja az osteoclastok kialakulását és feltételezhetően közvetlenül szerepet játszik a csontképzés szabályozásában [New Function of Cytokine and Life Phenomenon”, Special Issue of „Experimental Medicine”, 18. kötet, pp. 178-179., szerk.: Atsushi Miyajima, kiad.: Yodosha (2000)]. A fenti jellemzőinek köszönhetően az interleukin-18 allergiaellenes-, gyulladáscsökkentő-, vírusellenes-, antimikrobiális-, daganatellenes ágensként és immunológiai megbetegedések terápiájára történő alkalmazásával kapcsolatban előrehaladott kutatások folynak.

A jelenlegi kutatások egy része az interleukin-18 erős interferon- γ indukáló hatásával kapcsolatos. Jelentős kutatásokat végeznek továbbá az immunológiai megbetegedések terápiájában és megelőzésében feltehetően lényegi szerepet betöltő, a citokin *in vivo* vagy *in vitro* indukálásáért vagy amplifikálásáért felelős faktorról kapcsolatban is. Ez idáig már számos citokin-indukáló faktorról beszámoltak. A kutatások eredményeként sikeresen meghatározták egyes citokin-indukáló faktorok szerkezetét és működését, és ezen alapulva különböző megbetegedések kezelésére szolgáló, kereskedelmi forgalomban kapható gyógyászati készítményeket hoztak létre, amelyek az orvoslásban jelenleg is alkalmaznak.

Ezzel szemben a fentiekben említett gyógyászati készítményekben alkalmazott indukáló faktorok szinte mindegyike csupán a készítmény parenterális beadásakor fejt ki hatását, így a gyógyászati kezelés alkalmazását a beadási mód és a vele járó esetleges nem kívánatos gyógyszerreakciók vagy mellékhatások korlátozzák.

A találmány tárgyát hatását szájon át történő beadás esetén kifejtő interleukin-18-indukáló szer képezi, amely beadási mód csak elvétve vált ki nem kívánatos gyógyszerreakciót és amely pl. antiallergén hatással is rendelkezik.

A tejprotein citokin-képződésre gyakorolt hatására vonatkozó, a citokin indukáló faktorok keresésére irányuló kutatásaink eredményeként kimutattuk, hogy a tejsavóprotein-hidrolizátum elősegíti az interleukin-18 képződését.

A fentiekben felvetett problémára megoldást kínáló találmányunk tárgyát a következők képezik.

(1) Interleukin-18-indukáló anyag, amely aktív összetevőként interleukin-18-indukáló hatású, tejsavóprotein hidrolázzal végzett hidrolizálásával nyert tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmaz.

(2) Az (1) szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amely anyag előállítására alkalmazott hidroláz a következők közül egy vagy több lehet: *Bacillus subtilis* proteáz, tejsavbaktérium-proteáz, állati- vagy növényi eredetű proteáz.

(3) Az (1) vagy (2) szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amely esetében a tejsavóprotein-hidrolizátum hidrolízisének aránya 20-30% közötti.

(4) Az (1) – (3) bármelyike szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amelynek előállítása során egy 10.000 D molekulatömegű frakció eltávolításra került a tejsavóprotein-hidrolizátumból.

(5) A (4) szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amelynek előállítása során a 10.000 D molekulatömegű frakció ultraszűréssel lett eltávolítva a tejsavóprotein-hidrolizátumból.

(6) Az (1)-(5) bármelyike szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amely legalább 0,1 tömeg százalékban tartalmaz tejsavóprotein-hidrolizátumot.

(7) Eljárás interleukin-18-indukáló hatással rendelkező tejsavóprotein-hidrolizátum előállítására, amely során tejsavóproteint hidrolázzal hidrolizálunk, majd az így nyert hidrolizátumból egy 10.000 D-nál nagyobb molekulatömegű frakciót ultraszűréssel eltávolítunk.

A leírásban ellenkező értelmű jelzés hiányában a hidrolízis fokát kivéve a százalékos arány tömegszázaléokra vonatkozik.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerinti interleukin-18-indukáló szer aktív hatóanyagként interleukin-18-indukáló hatással rendelkező, tejsavóprotein hidrolázzal végzett hidrolizálásával nyert tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmaz. A találmány szerinti interleukin-18-indukáló szer előállításához alapanyagként alkalmazott tejsavóprotein tetszőleges eredetű lehet, amennyiben az alapanyag fő összetevőként tejsavóproteint tartalmaz. Előnyös azonban kereskedelmi forgalomban kapható tejsavóproteineket alkalmazni, amilyenek például a tejsavóprotein-kondenzátum (WPC) vagy a tejsavóprotein-izolátum (WPI). Alternatív módon, a tejsavóprotein tejből, sovány tejből, teljes tejporból vagy sovány tejporból a hagyományos eljárásokkal állítható elő.

A következőkben a tejsavóprotein hidrolázzal történő hidrolizálására szolgáló eljárást ismertetjük részletesebben. A tejsavóprotein nyersanyagot vízben vagy meleg vízben diszpergáljuk és oldjuk. Az oldat koncentrációja a találmány szerinti megoldás szempontjából nem lé-

nyeges. A hatékonyság és működőképesség szempontjából ugyanakkor rendszerint előnyös, ha a proteintartalomra számított koncentráció 5-15% közötti.

A szaprofita baktériumok okozta szennyeződés előidézte romlás megelőzése szempontjából előnyös, ha a tejsavóproteint tartalmazó oldatot 10 perc és 15 másodperc közötti időtartamban, 70-90°C közötti hőmérsékleten sterilizáljuk.

Előnyös továbbá, ha a tejsavóproteint tartalmazó oldat pH-ját lúgos vagy savas természetű anyag hozzáadásával a hidroláz pH-optimumára vagy annak közelére állítjuk be. A találmány szerinti megoldásban erre a célra tetszőleges sav vagy lúg igénybe vehető, amennyiben azok élelmiszeripari vagy gyógyászati célú felhasználása engedélyezett. A lúg lehet többek között nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, kálium-karbonát, a sav pedig pl. sósav, citromsav, foszforsav vagy ecetsav lehet.

A fentieket követően a tejsavóprotein oldathoz hidroláz oldatot adunk. A találmány szerinti megoldásban a hidroláz pontos típusa nem korlátozó jelentőségű, amennyiben az protein hidrolizálására alkalmas. A hidroláz előnyösen endopeptidáz. Endopeptidázként számos enzim igénybe vehető, ilyenek pl. a szerinproteázok, pl. a tripszin és az elasztáz, valamint a cisztinproteázok, pl. a papain és a bromelain. Közelebbről, a találmány szerinti megoldásban előnyösnek tekintett proteázok a *Bacillus subtilis* proteáz, a tejsavbaktérium-proteáz, valamint az állati- vagy növényi eredetű proteázok. Az „eredetű” kifejezés arra utal, hogy eredetileg az említett szervezet tartalmazza a proteázt, és nem arra, hogy a proteáz belőle lett kinyerve. Így pl. a *Bacillus subtilis* által termelt proteázt kódoló gént *Escherichia coli*-ba juttatva és ott expresszálva előállított proteáz *Bacillus subtilis*-ból „származik”.

A találmány szerinti megoldásban *Bacillus subtilis*-ból származó proteázként kereskedelmi forgalomban kapható termékek is igénybe vehetők. Ilyenek pl. a Protease N (Amano Enzyme Inc.) és a Biopraxe (Nagase Chemtex Corporation). A *Bacillus subtilis*-ból származó proteázt 1 g tejsavóproteinre számítva 100-5000 PUN egység mennyiségben alkalmazzuk (az említett egység pontos jelentését a későbbiekben részletezzük). A *Bacillus subtilis*-ból származó proteáz kazeinnel (Merck Ltd., Hammerstein) történő reagáltatásakor egy PUN egység a Folin-reagens 1 g tirozinnak megfelelő allil-aminosavval 30°C-on 1 percig tartó reakciója eredményeként kapott színreakcióval egyenértékű enzimaktivitást jelöl.

A tejsavbaktériumból származó proteáz az 54-36235 számú japán szabadalmi irat „Alkalmazott enzimek” c. része 6. rovatának 4. sorában ismertetett eljárás szerint állítható elő. Ennek során tejsavbaktériumot ismert eljárás szerint tenyésztünk (pl. 48-43878 számú japán szabadalmi irat), majd a tápközeg centrifugálásával tejsavbaktériumból álló sejttöledéket nye-

rünk. A sejtüledéket sterilizált vízben szuszpendáljuk, majd a tejsavbaktérium üledéket centrifugáljuk, ezt a folyamatot kétszer ismételjük. A sejtüledéket 20% koncentrációban sterilizált vízben szuszpendáljuk, majd sejtüledék-roncsoló berendezéssel (pl. „Dyno Mill”, KDL-típus; Willy Bachnfen Engineering Works) roncsoljuk, ezt követően liofilizálással a tejsavbaktériumból származó proteázport hozunk létre belőle. A tejsavbaktérium többek között *Lactococcus* nembe tartozó baktérium, pl. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* nembe tartozó baktérium, pl. *Lactobacillus helveticus* vagy *Lactobacillus bulgaricus*, valamint *Bifidobacterium* nembe tartozó baktérium, pl. *Bifidobacterium breve* vagy *Bifidobacterium longum* lehet.

A fentiek szerint előállított enzimből 20-200 aktivitási egységet adunk 1 g tejsavóproteinhez (az aktivitási egység magyarázatát ld. később). Az aktivitási egységet a következő eljárás szerint állapítjuk meg. Az enzimoldat előállításához a proteázt tartalmazó port 0,2 g/100 ml koncentrációban 0,1 M foszfátpufferben (pH = 7,0) diszpergáljuk vagy oldjuk. Ezzel párhuzamosan leucinil-p-nitroanilid („Leu-pNA”; Kokusan Chemical Co. Ltd.) 0,1 M foszfátpufferben (pH = 7,0) történő feloldásával 2 mM-os szubsztrátoldatot állítunk elő. A szubsztrátoldat és az enzimoldat 1-1 ml-ét 5 percig 37°C-on reagáltatjuk. Ezt követően a reakciót 2 ml 30%-os ecetsav hozzáadásával állítjuk le. A reakcióelegyet membránszűrőn átszűrjük, majd a kapott filtrátum abszorbanciáját 410 nm-en mérjük. Az 1 μmol Leu-pNA 1 perc alatt történő lebontásához szükséges enzimmennyiséget 1 aktivitási egységnek nevezzük. A proteáz aktivitását a következő képlet szerint határozzuk meg.

$$\text{Aktivitási egység (1 g porra)} = 20 \times (A/B)$$

A fenti kifejezésben az A és a B a minta és a 0,25 mM p-nitroanilin 410 nm-en mért abszorbanciáját jelenti.

Az állati- és vagy növényi eredetű proteáz lehet pl. tripszin, papain vagy bromelain.

A találmány szerinti megoldásban egy, vagy kettő vagy több hidroláz alkalmazható. Két vagy több enzim alkalmazása esetén az egyes enzimreakciók egyidejűleg vagy elkülönítve végezhetők.

Az oldatot, amelyhez az enzimet adjuk, a tejsavóprotein enzim általi hidrolízisének megkezdéséhez megfelelő hőmérsékleten, pl. 30-60°C-on, előnyösen 45-55°C-on tartjuk. A reakciót az enzimatis hidrolízis monitorozása mellett a hidrolízis kívánt arányának eléréséig folytatjuk. A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag aktív hatóanyagaként alkalmazott tejsavóprotein-hidrolizátum kinyerése érdekében végzett hidrolízis aránya előnyösen 20-30% közötti.

A protein hidrolízisének aránya a következőképpen számítható ki. A minta teljes nitrogéntartalmát a Kjeldahl-eljárás szerint számítjuk ki [„Method of Food Analysis”, p. 102, szerk.: Japanese Society for Food Science and Technology, kiad.: Korin Publishing Co., Ltd. (1984)], a mintabeli nitrogén által képzett formol mennyiségét a formoltitrálási eljárással állapítjuk meg [„Experiments of Food Engineering”, 1. kiadás, p. 547, szerk.: Mitsuda és mtsai., kiad.: Yokendo (1970)], a hidrolízis arányát pedig a fentiek szerint megállapított értékekből a következő képlet szerint számítjuk ki:

Hidrolízis aránya = (formol nitrogén mennyisége/összes nitrogén mennyiség) x 100.

Az enzimreakciót a hidrolízisoldatban lévő enzim inaktiválásával állítjuk le. Az enzimreakció leállítását a megszokott módon, melegítéses inaktíváló kezeléssel végezhetjük el. A sikeres inaktíváláshoz szükséges hőmérséklet és behatási idő az alkalmazott enzim hőstabilitásának figyelembe vételével állapítható meg. Az inaktíváláshoz elegendő például a 80-130°C-on 30 perc és 2 másodperc közötti időtartamban végzett kezelés.

Előnyös, ha a fentiek szerint kapott reakcióoldat pH-ját savval, pl. citromsavval 5,5-7,0 közöttire állítjuk be.

Előnyösnek tekintjük, ha a fentiek szerint előállított tejsavóprotein-hidrolizátumból eltávolítjuk a 10.000 D-t meghaladó molekulatömegű frakciót. Az „eltávolítás” kifejezés a 10.000 D-t meghaladó molekulatömegű frakció egy részének és egészének eltávolítását egyaránt magában foglalja. Előnyös ugyanakkor, ha az említett frakciót teljes egészében eltávolítjuk. Amennyiben az interleukin-18-indukáló funkció megmarad, még az sem okoz problémát, ha a 10.000 D-t meghaladó molekulatömegű frakció eltávolítása eredményeként a 10.000 D-nál nem nagyobb molekulatömegű frakcióbeli nagy molekulatömegű összetevők mennyisége csökkent is. A 10.000 D-t meghaladó molekulatömegű frakció eltávolítása pl. ultraszűréssel oldható meg. Az ultraszűrés ismert berendezéssel pl. ultraszűrő modullal végezhető (Asahi Kasei Corporation).

A tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmazó oldat kinyert állapotában is alkalmazható. Alternatív módon, amennyiben szükséges, a kapott oldatból ismert eljárás segítségével koncentrált oldat is kialakítható, majd a koncentrált oldat ismert eljárás segítségével történő kiszáritásával port nyerhetünk.

A fentiek szerint előállított tejsavóprotein-hidrolizátum interleukin-18-indukáló hatással rendelkezik. Ennek megfelelően a tejsavóprotein-hidrolizátum előállításához alkalmazott feltételek a tejsavóprotein-hidrolizátum interleukin-18-at indukáló képessége alapján határozhatók

meg. A találmány szerinti megoldásban az „interleukin-18-indukció” kifejezés alatt az interleukin-18-at termelő sejtek interleukin-18 termelésének indukcióját értjük.

Az interleukin-18-at biológiai szövetek és sejtek termelik, ilyenek pl. a makrofágok, pl. a Kupffer-sejtek, a bélnyálkahártya hámsejtjei és a hám keratinocitái. A bélhámsszövet interleukin-18 termelése különösen nagy mértékű. Az interleukin-18 *in vivo* termelésének nagy részéért feltehetően a bélhámsejtek felelősek. Ennek megfelelően a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag által kiváltott interleukin-18 termelés legegyszerűbben a biológiai rendszerbeli expressziós rendszernek megfelelő környezetet biztosító sejtvonal alkalmazásával igazolható. Az interleukin-18 termelésére előnyösen vastagbél-eredetű sejtvonalat alkalmazunk. Ilyenek például a következő sejtvonalak: Caco-2, COLO205, SK-CO-1, SW48, T84, HT-29, HCT-15 és LS180.

Az interleukin-18 termelése a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag sejtenyészethez adásával érhető el. Ennek során előnyösnek tekintjük, ha az aktív hatóanyagként alkalmazott tejsavóprotein-hidrolizátum legalább 1 µg/ml koncentrációban van jelen a sejtenyészetben. A sejtvonal tenyésztésére megfelelő, kereskedelmi forgalomban kapható tenyésztőközeg, pl. RPMI-1640 vagy „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (a továbbiakban szükség esetén „DMEM tápközeg”) alkalmazható. A tenyésztés folytatására alkalmas a „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” / „Ham’s F12 Medium” keveréke (a továbbiakban szükség esetén „DMEM/F12 tápközeg”). A fenti tápközeghez 5-20% emberi szérum, szarvasmarha szérum vagy magzati borjúszérum is adható. Szükség esetén a tápközeg emberi szérumalbuminnal, szarvasmarha szérumalbuminnal, antibiotikumokkal, ellenanyagokkal vagy 2-merkaptóetanollal is kiegészíthető. A poliakrilamidgél-elektroforézissel szeparált interleukin-18 anti-IL-18 ellenanyag alkalmazásán alapuló western-blot eljárással mutatható ki.

Ismert, hogy az immunglobulin E (IgE) ellenanyag általánosságban allergiás tüneteket, pl. bronchusasztmát, allergiás orrgyulladást, atópiás bőrgyulladást és táplálékallergiát okoz. Másrészt az is tudott, hogy az interleukin-18 *in vivo* elnyomja az IgE ellenanyag termelését [„Immune Reviews 2001”, Special Issue of „Experimental Medicine”, 19. kötet, 5. szám, p. 189, szerk.: Hajime Toriyama, kiad.: Yodosha (2001); Clinical Immunology 30, 191 (1998)]. Ennek megfelelően a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag szájon át történő beadásával előidézett interleukin-18-indukció az IgE ellenanyag-termelés elnyomásának vizsgálatával is igazolható.

Az interleukin-18 IgE ellenanyag termelésre gyakorolt gátlása előnyösen a ”helper” T-sejtek közül a Th1-nek a Th2 rovására történő indukálásán keresztül érvényesül. Kimutatták,

hogy az IgG1 ellenanyag és IgG2a ellenanyag termelése a Th1 és Th2 *in vivo* egyensúlyának indikátora [Cell Technology 19, 1828 (2000); Clinical Immunology 30, 191 (1998)]. Az interleukin-18 indukálásának hatása az ellenanyagok vérbeli koncentrációja arányának mérésén keresztül állapítható meg.

5 A tejsavóprotein-hidrolizátum, amely a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag aktív összetevője tejből származó természetes termék, ennél fogva a szájon át történő felvétel után jelentős stabilitást mutat. A tejsavóprotein-hidrolizátum megtalálható pl. a naponta fogyasztott tehéntejben. A tejsavóprotein-hidrolizátum nem toxikus és hosszabb időn keresztül történő, folyamatos felvétele esetén is csak elvétve okoz kedvezőtlen gyógyszerhatást vagy mellékhatást. Ennek megfelelően a tejsavóprotein-hidrolizátum beadására bármely beadási mód igénybe vehető, ilyen pl. a szájon át történő beadás. A tejsavóprotein-hidrolizátumból ismert eljárások segítségével pl. tabletta, kapszula, pasztilla, szirup, granulátum, por vagy kenőcs állítható elő. A drog vagy gyógyászati készítmény előállításához a tejsavóprotein-hidrolizátum mellett a drogelőállításban általában igénybe vett egyéb összetevők, pl. vivőanyagok vagy töl-
10 tőanyagok, pH-szabályozó anyagok, színezőanyagok, ízesítőszerke vagy ízjavító anyagok is alkalmazhatók. Emellett a készítmény bármely már ismert, vagy a jövőben megismerendő, interleukin-18-indukáló aktivitással rendelkező anyaggal is kombinálható.

A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag egyik megvalósítási módjaként a tejsavóprotein-hidrolizátum élelmiszer aktív hatóanyaga is lehet és belőle interleukin-18-indukáló
20 hatással rendelkező élelmiszer állítható elő.

A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag interleukin-18-indukáláshoz szükséges aktív hatóanyaga, a tejsavóprotein-hidrolizátum a végső keverék legalább 0,1 tömegszázalékában keverhető be a készítményekbe.

A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag alkalmazott adagja többek között a
25 páciens korától és tüneteitől függ. Az interleukin-18-indukció elérése érdekében azonban előnyös, ha az interleukin-18-indukáló anyag napi adagja legalább a 100 mg/testtömeg kg adag egy része.

A találmány szerinti megoldást az alábbiakban példákkal illusztrálva részletesebben ismertetjük. A találmány szerinti megoldás azonban nem korlátozódik az alábbi példákra.

30 1. példa

Savóprotein-hidrolizátum előállítása

Kereskedelmi forgalomban kapható tejsavóprotein kondenzátum (83% proteintartalom; Arla Foods Ingredients) 10 grammját 90 g, 106 mg nátrium-hidroxidot (San-Ei Gen F. F. I.

Inc.) tartalmazó tisztított vízben oldva pH = 8,5 kémhatású tejsavóprotein-oldatot kaptunk. A tejsavóprotein-oldathoz 14940 aktivitási egység (1800 aktivitási egység / 1 g protein) „Protease N”-t (Amano Enzyme Inc.), 1660 aktivitási egység (200 aktivitási egység / 1 g protein) „Biopraser”-t (Nagase Chemtex Corporation), 830 aktivitási egység (100 aktivitási egység / 1 g protein) *Lactobacillus helveticus* roncsolt sejttöledéket, valamint 10375 aktivitási egység (1250 aktivitási egység / 1 g protein) tripszint (Novozymes) adtunk, majd a hidrolízis elősegítése érdekében az oldat hőmérsékletét 50°C-on tartottuk. Az enzimreakciót a hidrolízis aránya alapján monitoroztuk. Amikor a hidrolízis aránya elérte a 25,7%-ot, az oldat 10 percre 85°C-ra történő melegítésével inaktívtuk az enzimeket. Ezután az oldatot 10°C-ra hűtöttük. A tejsavóprotein-hidrolizátumot 10.000 D molekulatömegnél frakcionáló ultraszűrő membránegységen (SLP-0053, Asahi Kasei Corporation) bocsátottuk át. Az így nyert frakció liofilizálásával kb. 8,3 g por alakú tejsavóprotein-hidrolizátumot nyertünk.

2. példa

Interleukin-18-indukáló anyag előállítása (1)

Egy 1000 ml-es mozsárba (Nakashima Seisakusho Co. Ltd.) 20 g kristályos cellulózt (Wako Pure Chemical Industries) helyeztünk, majd a felvétel elősegítése érdekében 20 ml vizet adtunk hozzá. Ezt követően előzetesen 48-as méretű szűrőn (Wakamori) átszűrte laktózt (Meggler GmbH) 25 g-ját, majd az 1. példa szerint előállított tejsavóprotein 55 g-ját adtuk a keverékhez. Az így kapott nedves anyagot 20-as méretű rozsdamentes acél szűrőre helyeztük (Wakamori), majd az anyagot kézzel átnyomva rozsdamentes acél tányérra juttattuk, az így képződött granulátumot a száradás érdekében gyorsan egyenletesen szétterítettük. A granulátumból ezután két napon át 25°C-on szárítógéppel végzett szárítással miniatűr granulátumot hoztunk létre. A granulátumot polietilénből készített 20-as méretű szűrőn (Wakamori) bocsátottuk át. A szűrőn átjutott granulátumot széles papírlapon egyenletesen szétterítettük. Ehhez az anyaghoz korábban 48-as szűrőn átbocsátott 2 g magnézium-sztearátot (Kanto Kagaku) adtunk, majd az anyagokból kézi keveréssel homogén keveréket hoztunk létre. A keverékből tablettakészítő berendezéssel (KT-2, Kimura Seisakusho) 8 mm átmérőjű R-rúd alkalmazásával, 10 tabletták készítésének megfelelő nyomóerő mellett tablettákat hoztunk létre. A tabletták tömege 6,2 g, Monsanto-féle keménységük 3,5-5,0 kg volt. Ezen az úton 16 db interleukin-18-indukáló hatású tablettát hoztunk létre, amelyek kb. 50% tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmaztak.

3. példa

Interleukin-18-indukáló anyag előállítása (2)

Hatszáz g laktózt (Meggle GmbH), 400 g kukoricakeményítőt (Nissin Seifun), 400 g kristályos cellulózt (Wako Pure Chemical Industries) és az 1. példa szerint előállított tejsavó-protein-hidrolizátum 600 g-ját 50-es méretű szűrőn (Yamato Scientific Co., Ltd.) átbocsátva nyert por alakú anyagot 0,5 mm-es vastagságú polietilén zsákba töltöttük, majd többszöri fel-le forgatással összekevertük, végül az anyagot 275 mg-os adagokban teljesen automatizált kapszulatöltő berendezés („prés” típusú, Sesser Pedini) segítségével kapszulákba (Japan Elanco, No. 1 zselatinkapszula, Op. Yellow No. 6 test, üres tömeg 75 mg) töltöttük. A fentiek eredményeként 7000 db, interleukin-18-indukáló hatású kapszulát nyertünk.

1. példaértékű vizsgálat

Ebben a vizsgálatban az interleukin-18-indukáló hatást tanulmányoztuk.

(1) Vizsgálati minták

Az 1., 2., 3. és 4. minta elkészítéséhez az 1. példa szerint előállított tejsavóprotein-hidrolizátumot 0,1 µg/ml, 1 g/ml, 10 g/ml és 100 g/ml koncentrációban 5% magzati borjúsérumot (GIBCO) tartalmazó DMEM/F-12 tápközegben (ICN Biomedicals, Inc., katalógusszám: 1-800-854-0530) oldottuk. Kontroll mintaként 100 µg/ml koncentrációban 5% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM/F-12 tápközegben szarvasmarha szérumalbumint oldottunk. Tejprotein kontroll minta előállítása érdekében az 1. példában a tejsavóprotein kondenzátumot kazeinre cserélve hidrolízissel nyert kazein-hidrolizátumot 100 µg/ml koncentrációban 5% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM/F-12 tápközegben oldottuk.

Az interleukin-18 indukálására Caco-2 (ATCC HTB-37) jelű bélhámsejt-vonalat alkalmaztunk.

(2) Vizsgálati eljárás

A Caco-2 jelű bélhámsejt-vonal sejtjeinek 1×10^4 mennyiségét 5% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM/F-12 tápközegben szuszpendáltuk. Az így kapott szuszpenzióból 1-1 ml-t 12 üregű tenyésztőtálca (Falcon) üregeibe juttattunk, majd a sejteket hat napig, konfluens állapotuk eléréséig tenyésztettük. Ezt követően a sejteket két alkalommal DMEM/F-12 tápközeggel mostuk, majd az üregekbe az 1-4. minták, a kontroll minta, a tejprotein kontroll minta és az 5% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM/F-12 tápközeg 1-1 ml-ét mértük, majd az inkubálást további 8 órán át folytattuk. A tenyésztést követően a tenyészetek felülúszóját aspirátor berendezés segítségével leszívtuk, majd a sejteket 4°C-on két alkalommal Dulbecco-

féle foszfát-pufferolt sóoldattal (a továbbiakban „PBS”) mostuk. Ezután a sejteket 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot (a továbbiakban „SDS”), 1% NP40-et, 0,5% nátrium-dezoxikolátot és 0,5 mM fenilmetánszulfonil-fluoridot tartalmazó PBS oldat 0,2 ml-ével lizáltuk. A sejtlizátumot a felülúszó kinyerése érdekében 10.000 fordulat/perc sebességgel 4°C-on 10 per-
 5 cen keresztül centrifugáltuk. Ebben a vizsgálatban az 1-4. minták, a kontroll minta, a tejprotein kontroll minta és az 5% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM/F-12 tápközeg jelenlétében tenyésztett sejtek lizátumának felülúszóját 1-4. mintának, kontroll csoportnak, tejprotein kont-
 roll csoportnak és negatív kontroll csoportnak neveztük.

Az egyes csoportok esetében megállapítottuk a minták proteintartalmát. Minden egyes
 10 csoportbeli proteinminta 10 µg-ját nem-redukáló állapotban 16%-os SDS poliakrilamid elektroforézis gélen (TEFCO) elektroforetizáltuk. Ezt követően a gélen szétválasztott protei-
 neket blottoló membránra (Hybond-P, Amersham Pharmacia) vittük. A blottoló membránt 5%-
 os koncentrációjú, PBS-ben hígított sovány tejjel (DIFCO) blokkoltuk. Ezt követően a memb-
 15 ránt 0,5 µg/ml koncentrációjú primer emberi interleukin-18 ellenanyaggal (MBL) 4°C-on 12
 órán át kezeltük. A blottoló membránt ezután mostuk, majd 1:5000 arányban hígított, peroxi-
 dázzal jelzett szekunder anti-egér IgG (MBL) oldatával 1 órán át inkubáltuk. A szekunder el-
 lenanyaggal történt kezelés után a membránt mostuk, majd „ECL Plus” (Amersham Pharmacia)
 fluoreszcens szubsztrátoldattal kezeltük. Közvetlenül ez után a fluoreszcens reakciót röntgen-
 film alkalmazásával mutattuk ki. Az így előállított képet denzitométer segítségével számszerű
 20 értékekké alakítottuk. A csoportok interleukin-18-indukáló aktivitását a negatív csoporthoz
 (mint 100%-hoz) viszonyított relatív aktivitásként határoztuk meg.

(3) Vizsgálati eredmények

A fentiekben részletezett vizsgálat eredményeit az 1. táblázat tartalmazza. Az 1. táblá-
 zatban az egyes csoportok interleukin-18-indukáló aktivitása látható. Amint az jól látható, a
 25 tejsavóprotein-hidrolizátum koncentrációjának emelésével az 1-4. kísérleti csoportok esetében
 nőtt az interleukin-18-indukáló aktivitás mértéke. Azt is megállapítottuk továbbá, hogy a fenti
 körülmények között a tejsavóprotein-hidrolizátum legalább 1 µg/ml-es tápközegbeli koncent-
 rációjánál lehetett interleukin-18-indukáló aktivitást megfigyelni. A kontroll csoportként alkal-
 mazott szarvasmarha szérumalbumin és a tejprotein kontroll csoportként alkalmazott kazein-
 30 hidrolizátum nem fokozta az interleukin-18 termelését. E vizsgálat eredményei alapján az
 interleukin-18-indukáló aktivitás a tejsavóprotein-hidrolizátumnak volt köszönhető.

1. táblázat

Vizsgálati csoport	IL-18-indukáló aktivitás (%)
1. kísérleti csoport	95,7
2. kísérleti csoport	125,0
3. kísérleti csoport	147,7
4. kísérleti csoport	214,7
Kontroll csoport	90,3
Tejprotein kontroll csoport	92,3

2. példaértékű vizsgálat

Ezt, a szérumbeli IgE ellenanyag mennyiségének meghatározásán alapuló vizsgálatot a
5 találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag hatékony adagjának megállapítása érdekében végeztük.

(1) Vizsgált minták

A vizsgálathoz az 1. példa szerint előállított tejsavóprotein-hidrolizátumot alkalmaz-
tunk 30 mg/ml koncentrációban élettani sóoldatban (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.) oldva.
10 Az élettani sóoldatot (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.) negatív kontrollként is igénybe vettük.

(2) Vizsgálati eljárás

Kísérleti állatként 50, véletlenszerűen 10 állatból álló kísérleti csoportokba sorolt hat-
hetes hímivarú BALB/c egeret (Charles River Japan) alkalmaztunk.

Antigénként 1 mg alumínium-hidroxid adjuvánsához (Wako Pure Chemical Industries)
15 adszorbeált 2,5 µg ovalbumint (Sigma) használtunk, amelyet intraperitoneális injektálással jut-
tattunk a kísérleti állatokba. A beadás után az állatokat három napig nem kezeltük. A vizsgált
mintákat három egymást követő napon gyomorszondán keresztül adtuk be, a tejsavóprotein-
hidrolizátum beadott adagja az egyes vizsgálati csoportok esetében 0 mg/testtömeg kg/nap
(negatív kontroll), 30 mg/testtömeg kg/nap, 100 mg/testtömeg kg/nap és 300 mg/testtömeg
20 kg/nap volt. Az állatokat ezután 4 napig nem kezeltük, majd három egymást követő napon
újabb kezelést végeztünk. Egy nap elteltével az egerek szívéből vett vérből szérummintákat
nyertünk.

A szérumminták IgE koncentrációját ELISA-val állapítottuk meg. Ennek során primer
ellenanyagként R35-92 jelzésű anti-egér IgE monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát 96
25 üregű mikrotiter tálcára (Nunc) jutattuk és egy éjszakán át 4°C-on adszorbeáltattuk. Ezután

szarvasmarha szérumalbuminnal blokkoló kezelést végeztünk, majd a lemez üregeibe jutattuk a vizsgált szérummintákat. Ezt követően szekunder ellenanyagként R35-118 jelzésű biotin-jelzett anti-egér IgE monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát, majd peroxidázzal jelzett avidin D-t (Vector Laboratories) juttattunk az üregekbe. A színreakció kialakulását peroxidáz szubsztrátoldat (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) mint színreakciót okozó pufferoldat hozzáadásával érték el. Az IgE koncentrációt a reakcióoldat abszorbanciájának 405 nm-es hullámhosszon történő mérésével állapítottuk meg. A kísérleti csoportokba tartozó 10 állat esetében kapott értékek átlagolásával határoztuk meg az egyes kísérleti csoportokra jellemző IgE koncentrációt.

(3) Vizsgálati eredmények

A vizsgálat eredményeit a 2. táblázat tartalmazza. A 2. táblázatban az interleukin-18-indukáló anyag beadott mennyisége és az IgE koncentráció közötti összefüggés látható. Amint a táblázat adataiból kiderül, a legalább 100 mg/kg testtömeg kg/nap adagban alkalmazott tejsavóprotein-hidrolizátum gátolta az IgE ellenanyag képződését. Ez az eredmény az IgE ellenanyag termelését gátló interleukin-18 sikeres *in vivo* indukálására utal.

2. táblázat

Az interleukin-18-indukáló anyag adagja (mg/ttkg/nap)	IgE koncentráció (ng/ml)
0	3965,2
30	3543,1
100	2684,3
300	2015,1

3. példaértékű vizsgálat

Ezt, a szérumbeli IgG1 és Ig2a ellenanyagok koncentrációja arányának meghatározásán alapuló vizsgálatot a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag hatékony adagjának megállapítása érdekében végeztük.

(1) Vizsgált minták

A vizsgálatához az 1. példa szerint előállított tejsavóprotein-hidrolizátumot alkalmaztunk 30 mg/ml koncentrációban élettani sóoldatban (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.) oldva. Az élettani sóoldatot (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.) negatív kontrollként is igénybe vettük.

(2) Vizsgálati eljárás

A szérumminták IgG1 és IgG2a koncentrációját a 2. példaértékű vizsgálatban ismertett ELISA-val határoztuk meg, azzal a különbséggel, hogy primer ellenanyagként A85-3 jelzésű anti-egér IgG1 monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát valamint R11-89 jelzésű anti-egér IgG2a monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát alkalmaztuk, szekunder ellenanyagként pedig A85-1 jelzésű, biotin-jelzett anti-egér IgG1 monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát valamint R19-15 jelzésű biotin-jelzett anti-egér Ig2a monoklonális ellenanyag (PharMingen) oldatát vettük igénybe.

(3) Vizsgálati eredmények

A vizsgálat eredményét a 3. táblázatban foglaltuk össze. A 3. táblázatban az interleukin-18-indukáló anyag beadott mennyisége és az IgG1/Ig2a koncentráció aránya közötti összefüggés látható. Amint a táblázat adataiból kiderül, a találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag beadott mennyiségének növelésével csökkent az IgG1/Ig2a koncentrációhányados értéke. Ilyen lényeges mértékű változás a legalább 100 mg/kg testtömeg kg/nap adagban alkalmazott tejsavóprotein-hidrolizátum esetén volt megfigyelhető. A vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy az interleukin-18 termelés indukálásával a Th1-et előnyben részesítő körülmények alakultak ki. Az interleukin-18 adagjának optimális mennyisége megegyezett a 2. példaértékű vizsgálatban megállapítottal.

3. táblázat

Az interleukin-18-indukáló anyag adagja (mg/ttkg/nap)	IgG1/IgG2a koncentráció-hányados
0	0,664
30	0,593
100	0,435
300	0,419

Ipari alkalmazhatóság

A fentiekben részletezettek szerint a találmány tárgyát aktív összetevőként tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmazó interleukin-18-indukáló anyag képezi. A találmány szerinti megoldás a következőket igazolja.

(1) Lehetőség van az interleukin-18 hatékony indukálására.

(2) Mivel az interleukin-18-indukáló anyag tejproteinből származik, így csak elvétve okoz kedvezőtlen gyógyszerhatást. A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag hosszú időn keresztül, folyamatosan alkalmazható.

5 (3) A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag szájon át adagolható. A hagyományos injekciós gyógyszerformával szemben ez a kiszerelés kényelmesen és rendkívül sokoldalúan alkalmazható.

(4) A találmány szerinti interleukin-18-indukáló anyag viszonylag olcsó alapanyagból, tehéntejből állítható elő, és tömegtermelésre is alkalmas.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Interleukin-18-indukáló anyag, amely aktív összetevőként interleukin-18-indukáló hatású, tejsavóprotein hidrolázzal végzett hidrolizálásával nyert tejsavóprotein-hidrolizátumot tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amely anyag előállítására alkalmazott hidroláz a következők közül egy vagy több lehet: *Bacillus subtilis* proteáz, tejsavbaktérium-proteáz, állati- vagy növényi eredetű proteáz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti interleukin-18-indukáló anyag, melynek esetében a tejsavóprotein-hidrolizátum hidrolízisének aránya 20-30% közötti.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amelynek előállítása során egy 10.000 D molekulatömegű frakció eltávolításra került a tejsavóprotein-hidrolizátumból.

5. A 4. igénypont szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amelynek előállítása során a 10.000 D molekulatömegű frakció ultraszűréssel lett eltávolítva a tejsavóprotein-hidrolizátumból.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti interleukin-18-indukáló anyag, amely teljes tömegére vonatkoztatva legalább 0,1 százalékban tartalmaz tejsavóprotein-hidrolizátumot.

7. Eljárás interleukin-18-indukáló hatású tejsavóprotein-hidrolizátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az eljárás során tejsavóproteint hidrolázzal hidrolizálunk, majd az így nyert hidrolizátumból egy 10.000 D-nál nagyobb molekulatömegű frakciót ultraszűréssel eltávolítunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

16 oldal
Fertő